



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**REGENERAÇÃO ÓSSEA COM CÉLULAS ESTAMINAIS DA  
POLPA DENTÁRIA**

Trabalho submetido por:

**Joana Reis de Leão Paínho**

Para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**Outubro de 2014**





**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**REGENERAÇÃO ÓSSEA COM CÉLULAS ESTAMINAIS DA  
POLPA DENTÁRIA**

Trabalho submetido por:

**Joana Reis de Leão Paínho**

Para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho Orientado por:

**Doutora Isabel Barahona**

**Outubro de 2014**



*À minha Mãe por saber que sou capaz.*

*Ao meu Pai que está lá sempre, mesmo quando não está.*

*À minha Irmã que não sei como, me atura.*

*À minha Avó que vibra com tudo o que eu faça.*

*Ao João por me fazer ver que quando se tomam decisões, a vida é mais fácil.*

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, à minha orientadora, Professora Isabel Barahona, por me ter aceitado e tornado o desafio ainda mais interessante com o seu ponto de vista. Pelo apoio, esclarecimento, paciência, e sempre, sempre boa disposição que sem dúvida me impulsionaram a concluir este projeto.

Aos colegas de percurso nesta vida, que me ensinaram a não desistir, aqui e em tudo, e a olhar sempre para a frente – João Mendes, Iris Kleine Schaars, Mariana Chagas, Diogo Mourato, Nuno Gonçalves, Joana Alves, João Pacheco, Margarida - direta ou indiretamente todos contribuíram para os momentos de trabalho, lazer, desespero e esperança. Quantas vezes foi um turbilhão dissolvido com um ombro amigo.

À minha Avó que está lá sempre com um olhar doce e uma chaveninha de café que me aquecem a alma e o espírito.

À minha família, pelo apoio, compreensão, e acima de tudo dedicação aos meus estados de espírito revolucionários em certos instantes, e por me quererem sempre ajudar. Aqui fica um pedido de desculpa, e um sincero obrigado.

Ao João, por cada palavra, cada telefonema, cada incentivo, cada impulso, sempre carregado de assertividade e calma que me mantiveram *on track* e cheia de vontade de trabalhar e fazer algo mais.

À minha *partner* do curso, de casa, de clínica, de festas, de estudos, de trabalho - Cláudia Pinto és a melhor colega de curso, parceira de box, braço direito que qualquer ser humano neste planeta poderia sonhar ter! Que a nossa amizade se mantenha sempre assim, assertiva, positiva e carregada de humor. O que será da MD sem ti?

E por fim, às para sempre, amigas de curso, as miúdas loucas que acompanharam, quase, cada segundo de cinco intensos anos - Cláudia Pinto, Marta Viegas, Marta Matos, Juliana Brito, Diana Silva e Susana Barroso. Venham de lá mais cinco!

Este trabalho é tanto meu, quanto de todas estas pessoas.

## Resumo

A reparação e regeneração de osso perdido é um tema importante na medicina oral e maxilofacial, e de um modo geral no corpo humano.

A perda de osso da cavidade oral tem origem em muitas causas: doenças congénitas ou degenerativas, traumas, consequência de procedimentos cirúrgicos. A falta de osso pré-existente constitui um problema funcional, com um impacto social cada vez maior. Desta forma, o tratamento desta condição é imperativo.

Cada vez mais, a abordagem para tratamento de situações clínicas de falta, passa pela regeneração do tecido em questão. Neste contexto a engenharia tecidual representa uma mais valia para a medicina regenerativa, pois através da combinação de biomaterias e mediadores biológicos consegue fornecer ferramentas que concretizam a sua prática, através de um conceito que engloba três componentes: células estaminais, *scaffolds* e moléculas sinalizadoras.

Pesquisas recentes já provaram que a polpa dentária é uma fonte ótima de células estaminais adultas: acessíveis, com grande potencial proliferativo, capazes de auto-renovação e diferenciação em várias linhagens celulares.

Vários estudos já demonstraram o potencial osteogénico das DPSC *in vitro*, bem como a sua capacidade de formar estruturas osteóides *in vivo*. Poucos demonstraram a capacidade de regenerar estruturas ósseas perdidas *in vivo*, contudo os resultados são inspiradores.

O objetivo desta revisão bibliográfica é explorar os estudos conduzidos até ao final de 2013, e verificar a praticabilidade dos métodos propostos. Tendo como objetivos específicos: expôr os protocolos praticados e conclusões sobre a viabilidade da utilização das DPSC, num âmbito da medicina regenerativa e engenharia tecidual, na regeneração de defeitos ósseos com que os clínicos se deparam diariamente na prática clínica.

*Palavras-Chave:* células estaminais da polpa dentária, diferenciação osteogénica, regeneração óssea, engenharia tecidual.

## Abstract

Repair and regeneration of lost bone is a major issue in oral and maxillofacial medicine and for the human body in general.

Bone loss of the oral cavity comes from many causes: congenital or degenerative diseases, trauma, secondary to surgical procedures. The lack of pre-existing bone is a functional issue, with an increasing social impact. Thus, the treatment of such condition is imperative.

Increasingly, the approach for treatment of clinical situations of lack is linked to the regeneration of the concerned tissue. In this context, tissue engineering is a plus for regenerative medicine because, by combining biomaterials and biologic mediators, can provide tools which concretize its practice, through a concept that comprises three components: stem cells, scaffolds and signal molecules.

Recent research has proven dental pulp as an optimal source of adult stem cells: accessible, with great proliferative potential, capable of self-renewal and differentiation into different cell lineages.

Several studies have shown the osteogenic potential of DPSC *in vitro*, as well as its ability to form osteoid structures *in vivo*. Few have shown the ability to regenerate lost bone structures *in vivo*, however the results are inspiring.

The purpose of this review is to explore the studies conducted before the end of 2013, and verify the feasibility of the proposed methods, with the following specific aims: expose practiced protocols and thus conclude whether it is feasible the use of DPSC, on a regenerative medicine and tissue engineering basis, in the regeneration of bone defects faced by clinicians in their daily clinical practice.

**Keywords:** dental pulp stem cells, osteogenic differentiation, bone regeneration, tissue engineering.



## Índice geral

<b>I.</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>13</b>
<b>II.</b>	<b>Desenvolvimento .....</b>	<b>15</b>
	<b>1. Células Estaminais .....</b>	<b>15</b>
	1.1 Conceito e propriedades de células estaminais .....	15
	1.2 Células estaminais embrionárias e adultas .....	16
	1.3 Células estaminais adultas: interesse na medicina dentária .....	17
	<b>2. Células Estaminais da Cavidade Oral .....</b>	<b>19</b>
	2.1 Células Estaminais da Polpa Dentária .....	20
	2.2 Células Estaminais de Dentes Decíduos Exfoliados .....	21
	2.3 Células Estaminais do Ligamento Periodontal .....	22
	2.4 Células Estaminais/Precursoras do Folículo Dentário .....	23
	2.5 Células Estaminais da Papila Apical .....	23
	2.6 Vantagens/Desvantagens da utilização das células da cavidade oral .....	25
	<b>3. As células ósseas e o osso da cavidade oral .....</b>	<b>26</b>
	3.1 Tipos e funções de células osteogénicas .....	26
	3.2 Matriz celular .....	27
	3.3 Características anatómicas do osso mandibular – diferenças para outros ossos.....	27
	3.4 Regeneração óssea .....	28
	<b>4. Regeneração Óssea com Células Estaminais da Polpa Dentária .....</b>	<b>29</b>
	4.1 Engenharia Tecidual .....	29

4.2 Estratégia de Pesquisa .....	30
4.3 Regeneração óssea de defeitos mandibulares com células da polpa dentária: modelo experimental animal .....	31
4.3.1 Zheng et al., 2009 .....	31
4.3.2 Liu et al., 2010 .....	32
4.3.3 Yamada et al., 2010 .....	35
4.4 Regeneração óssea de defeitos mandibulares com células da polpa dentária: modelo experimental humano .....	37
4.4.1 R d'Aquino et al., 2009 .....	37
4.4.2 Giuliani et al., 2013 .....	46
<b>III. Conclusão .....</b>	<b>50</b>
<b>IV. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>51</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Classificação de células estaminais adultas de acordo com a sua origem e localização .....	17
<b>Figura 2:</b> Esquema representativo da anatomia dentária .....	20
<b>Figura 3:</b> Esquema representativa da TE aplicada à regeneração óssea da cavidade oral .....	30
<b>Figura 4:</b> Análises TC e Histológica .....	32
<b>Figura 5:</b> Fotografia representativa do defeito alveolar criado .....	33
<b>Figura 6:</b> Radiografias do defeito; aparência do defeito alveolar das 0 às 12 semanas.....	34
<b>Figura 7:</b> Esquema experimental do protocolo seguido .....	36
<b>Figura 8:</b> Fotografias da análise macroscópica da regeneração ocorrida .....	37
<b>Figura 9:</b> Procedimento cirúrgico.....	41
<b>Figura 10:</b> Radiografia de controlo, 7 dias após intervenção cirúrgica .....	44
<b>Figura 11:</b> Radiografia de controlo, 30 dias após intervenção cirúrgica; é evidente no local T a iminente regeneração .....	44
<b>Figura 12:</b> Radiografia de controlo, 3 meses após intervenção.....	44
<b>Figura 13:</b> Radiografia de controlo, um ano após intervenção.....	45
<b>Figura 14:</b> Radiografias dos locais T e C de um doente antes da cirurgia .....	47

## Índice de Tabelas

**Tabela 1:** Tabela representativa do potencial de diferenciação e marcadores expressos, pelos dos cinco tipos de células estaminais da cavidade oral .....24

**Tabela 2:** Tabela resumo dos estudos apresentados referendo autor, modelo experimental, fonte celular, portador/*scaffold*, tipo de defeito, método de avaliação, tempo de avaliação e resultados ..... 49

## **Lista de Abreviaturas**

ASC *Adult Stem Cells*, Células Estaminais Adultas

BAP *Bone Alkaline Phosphatase*, Fosfatase Alcalina Óssea

BMMSC *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*, Células Estaminais Mesenquimais da Medula Óssea

BMP-2 *Bone Morphogenic Protein-2*, Proteína Morfogénica Óssea

$\beta$ -TCP  *$\beta$ -Tricalcium Phosphate*, Fosfato Tricálcico  $\beta$

CEJ/JAC Junção Amelo-cimentária

CHX Clorhexidina

DF *Dental Follicle*, Folículo Dentário

DFPC *Dental Follicle Progenitor Cells*, Células Progenitoras do Folículo Dentário

DPSC *Dental Pulp Stem Cells*, Células Estaminais da Polpa Dentária

DTSC *Deciduous Tooth Stem Cells*, Células Estaminais de Dentes Decíduos

ES *Embryonic Stem Cells*, Células Estaminais Embrionárias

IF Imunofluorescência

IGF-I *Insulin Growth Factor-I*, Fator de Crescimento Insulina I

iPSC *Inducted Pluripotent stem cells*, Células Estaminais Pluripotentes Induzidas

LED Longo Eixo do Dente

MSC *Mesenchymal Stem Cells*, Células Estaminais Mesenquimais

nHAC/PLA Nano-hidroxiapatite/Colagénio/Poli-láctico

OC Osteocalcina

ON Osteonectina

OP Osteopontina

PDGF *Plasma Derived Growth Factors*, Fatores de Crescimento Derivados do Plasma

PDLSC *Periodontal Ligament Stem Cells*, Células Estaminais do Ligamento  
Periodontal

PRP *Platelet Rich Plasma*, Plasma Rico em Plaquetas

SCAP *Stem Cells from Apical Papilla*, Células Estaminais da Papila Apical

SHED *Exfoliated Deciduous Teeth Stem Cells*, Células Estaminais dos Dentes Decíduos  
Exfoliados

SR-HT Holotomografia baseada em radiação sincontron

TC Tomografia Computorizada

TE *Tissue Engineering*, Engenharia Tecidual

TGF- $\beta$  *Transforming Growth Factor- $\beta$* , Factor de Crescimento transformante- $\beta$

rhBMP-2 Proteína Morfogénica Óssea-2 Humana Recombinante

## I. INTRODUÇÃO

A perda de osso alveolar e peças dentárias na cavidade oral é um problema de saúde oral, que causa problemas funcionais, com crescente impacto social (Aquino et al., 2009).

A reparação e regeneração de osso da cavidade oral é um desafio na medicina oral e maxilofacial, diariamente observado na prática clínica.

A perda de osso e os defeitos ósseos podem ocorrer por múltiplas causas, desde doenças congênitas ou degenerativas – como cárie e doença periodontal – trauma, ressecção tumoral, cirurgia, malformações, fraturas osteoporóticas etc. (Yamada, Ito, Nakamura, Ueda, & Nagasaka, 2011).

Ao contrário de outros tecidos no organismo, o osso tem a capacidade de auto-regeneração e auto-reparação, e em muitas circunstâncias lesões e fraturas curam sem deixar tecido de cicatrização (Oryan, Alidadi, Moshiri, & Maffulli, 2014).

Há no entanto, situações clínicas nas quais a regeneração fisiológica é insuficiente e a necessidade de intervenção é imperativa para devolver ao tecido a sua antiga arquitetura.

Atualmente, na prática clínica, existe um sem número de estratégias diferentes que promovem o processo de regeneração óssea, incluindo o enxerto de osso autólogo (considerado o “gold standard”), enxerto livre vascularizado, aloenxerto, uso de fatores de crescimento, membranas osteocondutoras, distração osteogénica etc. (Dimitriou, Jones, McGonagle, & Giannoudis, 2011).

Ainda que considerado o “*gold standard*”, o enxerto autólogo apresenta sérias desvantagens. A crista ilíaca é o local de eleição para retirar grandes quantidades de osso, e ainda que possível, a colheita para enxerto acarreta uma série de complicações pós-operatórias como dor, quantidade recolhida limitada, morbilidade, hérnia (Ahlmán, Patzakis, Roidis, Sheperd & Holtom, 2002; Velchuru, Satish, Petri & Sturzaker, 2006).

Defeitos ósseos grandes representam um problema clínico major na medida em que os enxertos autólogos não se encontram disponíveis em mais de 40% dos casos (M Atari et al., 2012).

Há portanto uma pressão/necessidade subjacente associada a soluções efetivas, que restabelecem as estruturas perdidas e devolvam a função fisiológica, devolvendo não só as estruturas perdidas, mas o bem-estar aos doentes.

Neste contexto, a união entre Engenharia Tecidual e Medicina Regenerativa (*Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, TERM) representa uma solução brilhante – estas duas áreas do conhecimento completam-se na busca por soluções que combinam biomateriais e mediadores biológicos na tentativa de regenerar tecidos, ao invés de os substituir (M Atari et al., 2012).

O conceito da TERM é regenerar tecidos com recurso a três elementos – células estaminais, *scaffolds* e moléculas sinalizadoras (Yamada et al., 2011). No caso da engenharia tecidual óssea são necessárias: células osteoprogenitoras, *scaffolds* tridimensionais e fatores indutores de osteogénese (Li et al., 2011).

A polpa dentária representa particular interesse para a medicina regenerativa dada a sua acessibilidade e potencial diferenciador do tecido (M Atari et al., 2011). O seu potencial diferenciador estende-se a células neurogénicas, condrogénicas, miogénicas, e osteogénicas, apresentando portanto, um potencial de diferenciação em tecido ósseo (Gronthos, Mankani, Brahimi, Robey, & Shi, 2000).

Apesar de amplamente estudado *in vitro*, poucos são os estudos que demonstram a efetividade das células estaminais da polpa dentária (DPSC) para fins de regeneração óssea *in vivo*. O objetivo deste trabalho é esclarecer o papel das DPSC na regeneração de defeitos ósseos mandibulares *in vivo*, e analisar a sua praticabilidade clínica, já que representa uma fonte tão promissora de autotransplante.



## **II. DESENVOLVIMENTO**

### **1. Células estaminais**

#### **1.1 Conceito e propriedades de células estaminais**

A célula estaminal é uma célula indiferenciada, comum a todos os organismos multicelulares. Caracteriza-se pela sua enorme capacidade de auto-renovação – pois pode passar por inúmeros ciclos de divisão celular mantendo o seu estado indiferenciado - e potência - podendo diferenciar-se em diferentes tipos de células maduras (Avasthi, Ms, & Ms, 2008). Em virtude destas duas propriedades, as células estaminais têm a capacidade de gerar vários tipos de células teciduais.

A potência é a propriedade de uma célula estaminal que determina a capacidade de diferenciação da mesma, que se classifica em: totipotência, pluripotência, multipotência e unipotência (Leeb, Jurga, McGuckin, Moriggl, & Kenner, 2010).

Células estaminais totipotentes são resultantes da fusão de um óvulo com um espermatozóide, e as produzidas a partir das subsequentes divisões celulares do óvulo fertilizado (mórula - até ao estágio com 8 células, todas são consideradas totipotentes); estas células conseguem diferenciar-se em tipos celulares dos três folhetos embriogénicos - endoderme, ectoderme e mesoderme - e extra embrionários como a placenta, e são assim capazes de gerar um organismo viável (Leeb et al., 2010).

As células pluripotentes são descendentes das células totipotentes, e, conseguem também originar células das três camadas embrionárias, mas não dos tecidos extra-embrionários; são provenientes do blastocisto - uma formação esférica de células, gerada a partir da mórula, rodeada por camadas dos três folhetos embriogénicos, e interiormente preenchida por fluido intersticial e uma massa celular, onde se encontram as células pluripotentes;

As células multipotentes geram um número limitado de células, uma família de células - como a célula estaminal hematopoiética que dá origem às várias células do sistema hematopoiético (mastócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, plaquetas, eritrócitos e linfócitos);

As células unipotentes não conseguem produzir outro tipo celular que não o seu, mas têm a capacidade de auto-renovação característica de célula estaminal – como por exemplo a célula muscular (Leeb et al., 2010).

## **1.2 Células estaminais embrionárias e adultas**

As células estaminais podem-se dividir de acordo com a sua origem, em dois grandes grupos: células estaminais embrionárias (ESC), derivadas do blastocisto, e as células estaminais adultas (ASC) (Mckay, 2000), encontradas nos tecidos adultos, cuja função no organismo adulto é a reparação de tecidos danificados, em necrose ou em falta (Moralada et al., 2006).

Num embrião, as ESC possuem a capacidade de se diferenciarem em todos os tipos celulares de um organismo, conseguindo originar mais de 220 tipos celulares diferentes (Avasthi et al., 2008). Num organismo adulto, as ASC são responsáveis pela reparação e manutenção de um órgão ou sistema ao longo da vida, através da sua capacidade de diferenciação restrita a uma família de células (Moralada et al., 2006).

As ASC de mamíferos, por sua vez, podem-se dividir em dois grupos de acordo com a sua origem: germinais ou somáticas. As germinais, são células diplóides ( $2n$ ), que se dividem por meiose e dão origem aos gametas – espermatozóides e óvulos que são haplóides; as somáticas, são vários tipos de células diplóides ( $2n$ ), que se dividem por mitose, e podem-se encontrar em diferentes locais de um organismo (Jamal, Chogle, Goodis, & Karam, 2011).

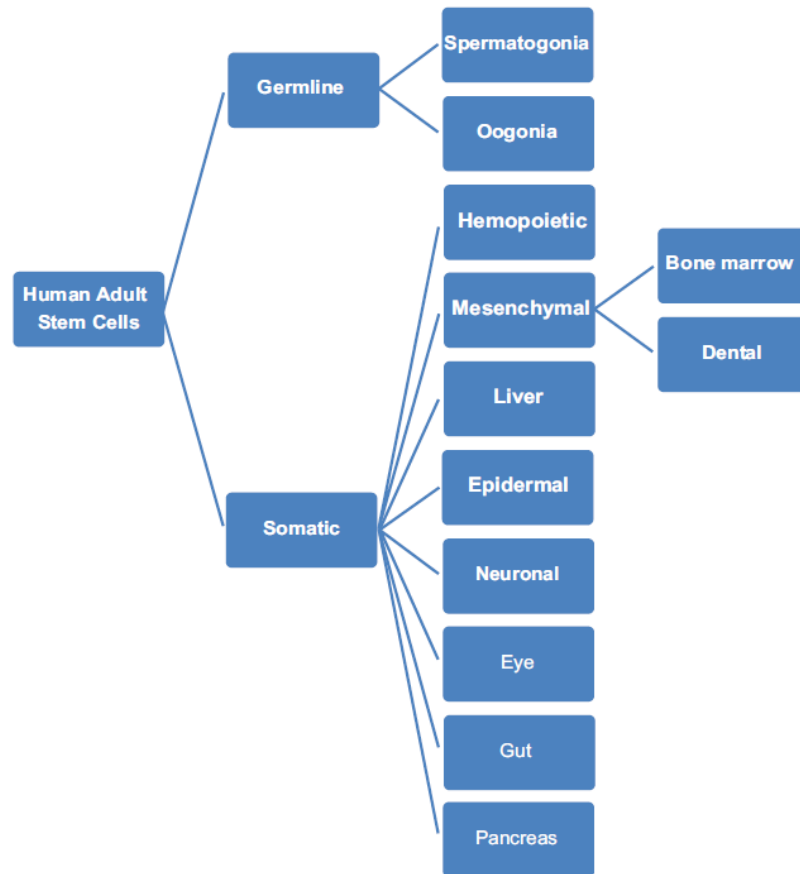


Figura 1: Classificação de células estaminais adultas de acordo com a sua origem e localização, adaptado de Jamal et al., 2011.

### 1.3 Células estaminais adultas: interesse na medicina dentária

Células somáticas como as MSC (*Mesenchymal Stem Cells*) encontram-se no estroma da medula óssea adulta e em muitos outros locais; apresentam um carácter multipotente com capacidade de diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos etc. (Jamal et al., 2011).

A fim de assegurar a auto-renovação, as células estaminais sofrem dois tipos de divisão celular: a divisão simétrica e a divisão assimétrica. Na divisão simétrica a célula mãe divide-se em duas células filhas idênticas a si. Na divisão assimétrica dá origem a uma célula filha idêntica à célula mãe, e outra célula com potencial auto-renovador limitado - uma célula mais especializada. A célula progenitora pode sofrer um sem número de divisões até se diferenciar numa célula madura (Avasthi et al., 2008).

Pensa-se que as células estaminais adultas migram para os locais onde os tecidos sofreram alterações e aí se diferenciam em tipos celulares específicos, reparando assim os tecidos. Têm alto potencial de expansão *in vitro* e auto-renovação. Desta forma, células estaminais adultas, de fonte autóloga, representam meio acessível e conveniente para a terapia regeneradora baseada em células, apresentando um potencial clínico realista (Leeb et al, 2010).

Há ainda outro tipo de células estaminais, um tipo celular induzido laboratorialmente, as células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC). Este tipo de células resulta da reprogramação epigenética baseada na ação de fatores de transcrição. Desta forma, podem gerar-se células pluripotentes a partir de células adultas, através de fatores de transcrição específicos tais como Oct-4, Sox-2, c-Myc e Klf-4 (Takahashi & Yamanaka, 2006).

As células estaminais embrionárias têm alto potencial neoplásico/diferenciador, e por isso a sua utilização é controversa e envolta em questões éticas e legais. Desta forma, as células estaminais adultas apresentam uma alternativa, já que é possível reprogramá-las ao estado de pluripotência, capacidade que representa a maior vantagem das ESC associada à capacidade de não induzir a rejeição do tecido transplantado pelo hospedeiro (Takahashi & Yamanaka, 2006).

As ASC são necessárias ao normal “turnover” celular e reparação dos tecidos, em processos que ocorrem ao longo da vida. Encontram-se em inúmeros tecidos, e acessíveis para colheita, expansão e transplante. Desta forma, tornaram-se apelativas à medicina regenerativa e engenharia tecidual como fonte de células estaminais acessível (Moraleta et al., 2006), para tratamento autólogo de doenças degenerativas, congénitas e trauma, (Leeb et al., 2010) já que representam uma fonte autóloga de enxerto/tecido que não acarreta problemas de rejeição, sendo do próprio, nem questões éticas - ao contrário das ESC (Takahashi & Yamanaka, 2006).

## 2. Células estaminais da cavidade oral

A crescente curiosidade por células estaminais somáticas acessíveis, de caráter multipotente e associadas a baixa morbidade conduziu à descoberta de novos nichos de células estaminais no organismo.

As células estaminais mesenquimais – MSC – foram inicialmente caracterizadas no estroma da medula óssea adulta. São células multipotentes com a capacidade de se diferenciar em osteoblastos (osso), condrócitos (cartilagem) e adipócitos (tecido adiposo) (Huang, Gronthos, & Shi, 2009).

Dado o perfil multipotente, e consequente versatilidade, as MSC são utilizadas na engenharia tecidual para a aplicação em várias terapias. No sentido de encontrar outras fontes de colheita de MSC, vários estudos mostraram que elas existem em vários outros órgãos, incluindo o órgão dentário.

Em 2000 Gronthos *et. al* isolou pela primeira vez células estaminais da polpa dentária (DPSC). A identificação de populações de células estaminais somáticas numa fonte acessível, como é a cavidade oral, progrediu, e assim com o decorrer dos anos descobriram-se vários nichos de células estaminais na cavidade oral – células estaminais da polpa de dentes decíduos exfoliados (SHED) (Miura et al., 2003), células estaminais do ligamento periodontal (PDLSC)(Seo et al., 2004), células precursoras do folículo dentário (DFPC)(Morszeck et al., 2005), e por fim, células estaminais da papila apical (SCAP) (Sonoyama et al., 2006).

Um dente é maioritariamente constituído por tecidos duros. O tecido mais duro, o esmalte, constitui a camada exterior que protege a dentina, a segunda camada de maior dureza, que através de milhares de túbulos dentinários comunica com a polpa, que encapsula, o tecido mole nuclear do dente, ricamente innervado e altamente vascularizado. Por sua vez este complexo, encontra-se anexado ao alvéolo, aderente ao osso alveolar, através de um tecido conjuntivo denso – o ligamento periodontal (PDL).

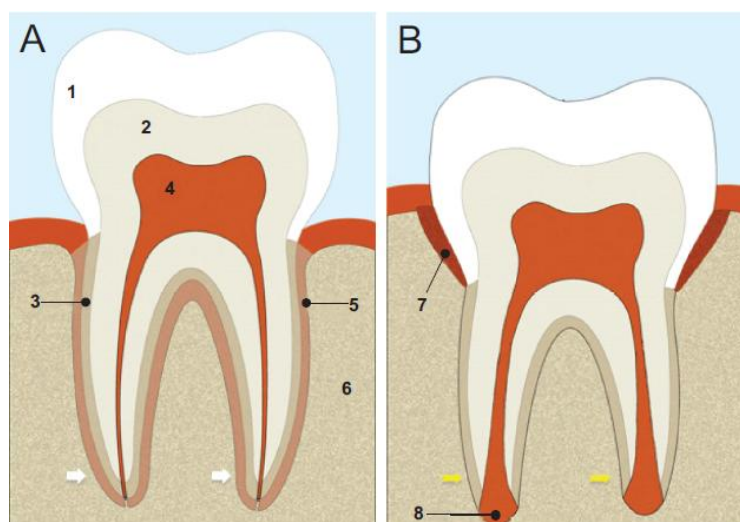


Figura 2: Esquema representativo da anatomia dentária; 1 – Esmalte; 2 – Dentina; 3 – Cimento radicular; 4 – Polpa dentária; 5 – Ligamento periodontal; 6 – Osso alveolar; 7 – Folículo dentário; 8 – Papila apical. Adaptado de Jamal et al., 2011.

## **2.1 Células estaminais da polpa dentária (DPSC)**

Como mencionado anteriormente, as DPSC foram o primeiro tipo de células estaminais dentárias isoladas, obtidas a partir de digestão enzimática do tecido pulpar de terceiros molares inclusos por Gronthos, Mankani, Brahim, Robey & Shi, em 2000.

As DPSC apresentam uma morfologia típica de fibroblasto, são naturalmente clonogênicas e conseguem manter um elevado potencial de diferenciação mesmo após várias passagens celulares em laboratório (Gronthos et al., 2000).

As DPSC não expressam um marcador específico que as identifique, mas sim diversos marcadores característicos das células mesenquimais e da medula óssea, como STRO-1 e CD146, bem como marcadores de células estaminais embriogênicas como Oct4 (Gronthos et al., 2000).

A cultura de DPSC em diferentes meios de cultura demonstrou o seu potencial dentinogênico, osteogênico, adipogênico, neurogênico, condrogênico e miogênico. As DPSC demonstraram manter a sua capacidade de auto-renovação quando transplantadas em modelos experimentais animais, bem como capacidade de formação de tecido-tipo pulpar, células idênticas a osteoblastos, dentina ectópica, dentina-tipo reparadora e tecidos osseóides (bone-like tissues) (Gronthos et al., 2000).

Dado o seu forte potencial diferenciador e caráter multidiferenciável, as DPSC consagram a sua natureza estaminal e apresentam um papel promissor em terapias regenerativas.

## **2.2 Células estaminais da polpa de dentes decíduos exfoliados (SHED)**

Em 2003, Miura *et al.* isolou células pulparez altamente proliferativas e clonogénicas. A técnica de isolamento foi semelhante à utilizada no isolamento das DPSC. Contudo foram verificadas duas diferenças: a fonte celular foi o tecido pulpar da coroa de dentes decíduos exfoliados, e, as SHED isoladas não cresceram como células individuais, mas aglomeradas em colónias que, após separação, crescem como células individuais idênticas a fibroblastos.

As SHED apresentam uma taxa de proliferação superior e um maior número de colónias celulares em relação às DPSC. As SHED apresentaram marcadores de células estaminais mesenquimais – STRO-1 e CD146 – marcadores embriogénicos - Oct4 e Nanog – antígenos embriogénicos estágio-específicos – SSEA-3 e SSEA-4 – e também antígenos de reconhecimento tumoral – TRA-1-60 e TRA-1-81 (Miura et al., 2003).

O potencial de diferenciação multicelular das SHED foi demonstrado sob diferentes condições indutivas. As SHED demonstraram diferenciação osteogénica e adipogénica. Quando em meio de cultura indutor de neurogénese, formam aglomerados esféricos e alteraram a sua morfologia fibroblástica para células com múltiplos prolongamentos citoplasmáticos. Ainda sob o mesmo meio neurogénico, as SHED expressam marcadores neuronais típicos e de células da glia como a nestina. A expressão destes marcadores sugere que as SHED têm origem na crista neural (Miura et al., 2003).

As SHED transplantadas em ratinhos imunocomprometidos, formam uma estrutura do tipo dentina, imunoreativa ao anticorpo específico da dentina – sialofosfoproteína. Associadas a esta estrutura do tipo dentina regenerada, foram encontradas células do tipo osteoblásticas, o que indica que as SHED têm um potencial diferenciativo odontogénico (Miura et al., 2003).

Contudo, e ao contrário das DPSC, as SHED não foram capazes de formar um complexo polpa-dentina após transplante *in vivo*. Este facto indica que as SHED têm

um potencial de diferenciação odontogénico diferente das DPSC. Relativamente ao potencial osteogénico, foi interessante verificar que as SHED, ao contrário das DPSC, não foram capazes de se diferenciar em osteoblastos ou osteócitos, mas foram capazes de induzir as células do tecido hospedeiro a uma diferenciação osteogénica. Esta é outra diferença entre as SHED e a DPSC que demonstra que, as SHED têm um potencial osteoindutor mais do que um potencial osteodiferenciador (Miura et al., 2003).

Devido à sua alta taxa de proliferação, ao contrário das DPSC, e ao seu potencial de diferenciação odontogénico e osteogénico, as SHED aparentam ser distintas das DPSC e parecem ser uma forma mais imatura das DPSC (Miura et al., 2003).

### **2.3 Células estaminais do ligamento periodontal (PDLSC)**

O ligamento periodontal, LPD, não só liga o dente ao alvéolo, como também contribui para a sua nutrição, homeostase e reparação. O LPD contém diferentes tipos de células, incluindo células capazes de diferenciação em cimentoblastos e osteoblastos.

As PDLSC foram isoladas em 2004 por Seo et al., a partir do LPD separado das raízes de terceiros molares inclusos, com o mesmo método de isolamento que as pioneiras DPSC e SHED. As células isoladas exibiam morfologia típica de fibroblasto, clonogénicas, e demonstraram alta taxa de proliferação em comparação com as DPSC e as MSC da medula óssea (Seo et al., 2004).

As PDLSC expressam STRO-1, CD46 e Scleraxis (factor de transcrição específico do tendão) – em maior quantidade do que as DPSC e MSC da medula óssea (Seo et al., 2004). Na medida em que o LPD e o tendão apresentam um conteúdo estrutural idêntico, rico em fibras de colagénio denso, e ambos têm como função de absorver o stress mecânico durante a atividade fisiológica normal – num caso as forças mastigatórias, no outro a impulsão da marcha – seria de esperar houvesse semelhanças.

As PDLSC apresentam capacidade de diferenciação osteogénica, adipogénica e condrogénica, quando cultivadas em meio adequado. Quando transplantadas em ratinhos imunocomprometidos, formam uma estrutura cimento-típica do LPD, estrutura que não foi produzida por DPSC ou MSC da medula óssea. Este novo tecido formado a partir de PDLSC era composto por colagénio tipo I, e estava conectado ao cimento da



mesma maneira que as fibras de Sharpey do LPD se ligam ao cimento do dente (Seo et al., 2004).

#### **2.4 Células Precursoras do Folículo Dentário (DFPC)**

O folículo dentário (DF), é um tecido conjuntivo laxo de origem ectomesenquimal e apresenta-se como um sáculo que envolve o dente por erupcionar . Descobriu-se que, durante o desenvolvimento dentário, o DF tem um papel importante na erupção visto controlar a osteoclastogénese e a osteogénese requerida para a erupção do dente. Crê-se também que o DF se diferencia em periodonto assim que o dente erupciona, e atinja uma posição visível na cavidade oral. Sendo o periodonto um tecido constituído por inúmeras células, foi proposta a presença de células estaminais dentro do folículo dentário, que mais tarde, irão dar origem ao periodonto (Jamal et al., 2011).

Em 2005, Morscheck *et al.* isolou células estaminais do folículo dentário de terceiros molares inclusos, através da mesma metodologia utilizada no isolamento e cultura das DPSC. As células encontradas eram fibroblásticas típicas e expressavam marcadores como Nestina e Notch-1.

As DFPC são capazes de diferenciação osteogénica, adipogénica e neurogénica. Quando comparado o potencial diferenciador neurogénico das DFPC com o das SHED, encontrou-se padrões de expressão de marcadores neurogénicos diferentes (Morscheck et al., 2005), o que pode indicar um potencial de diferenciação neuronal diferente. As DFPC foram também capazes de se diferenciar e expressar marcadores cimentobásticos – proteína de adesão (attachment) do cimento e proteína-23 do cimento – após indução com derivados da matriz de esmalte ou BMP-1 e BMP-7 (Morscheck et al., 2005).

#### **2.5 Células estaminais da papila apical (SCAP)**

Durante o desenvolvimento dentário, a papila apical desenvolve-se para dentro da polpa dentária, e contribui para o desenvolvimento da raiz. A porção apical da papila apical encontra-se levemente aderente à raiz em desenvolvimento, e encontra-se separada do tecido pulpar diferenciado por uma zona celular rica – a zona da papila apical (Sonoyama et al., 2006; Sonoyama et al., 2008)

Em 2006, Sonoyama et al. isolou pela primeira vez as SCAP. Morfologicamente idênticas a fibroblastos, clonogênicos, e com maior taxa de proliferação que as DPSC, expressam marcadores de superfície mesenquimais primitivos, STRO-1 e CD146, expressando ainda CD24, marcador único para esta população celular (Sonoyama et al., 2009).

São capazes de diferenciação em células dentinogênicas funcionais, diferenciação osteogênica, adipogênica, condrogênica e neurogênica, quando no meio de cultura apropriado (Sonoyama et al., 2009).

À semelhança das DPSC, quando transplantadas em ratinhos imunocomprometidos numa matriz adequada, as SCAP formaram uma estrutura polpa-dentina com células odontoblásticas típicas (Sonoyama et al., 2009).

	DPSC <sup>7</sup>	SHED <sup>8</sup>	PDLSC <sup>9</sup>	DFPC <sup>11</sup>	SCAP <sup>10</sup>
Source	Dental Pulp	Dental Pulp <sup>‡</sup>	Periodontal ligament	Dental Follicle	Apical Dental Papilla
<b>Differentiation potential (<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>)</b>					
Adipogenic	+	+	+	+	+
Chondrogenic	+	+	+	+	ND
Myogenic	+	+	ND	+	ND
Neurogenic	+	+	+	+	+
Odontogenic	+	+	+	+	+
Osteogenic	+	+	+	+	+
<b>Stem cell markers</b>					
CD146	+	+	+	+	+
Nanog		+			
Nestin	+	+		+	+
Notch-1				+	
OCT4	+	+			
STRO-1	+	+	+	+	+

‡ From primary tooth

+\* After induction

ND Not determined

Tabela 1: Tabela representativa do potencial de diferenciação e marcadores expressos, pelos dos cinco tipos de células estaminais da cavidade oral; adaptado de Jamal et al., 2011.

A partir da tabela pode concluir-se que todas as formas de células estaminais da cavidade oral apresentam potencial de diferenciação osteoblástico, osteogénico e adipogénico, *in vitro* e *in vivo*. À exceção das SCAP, todas apresentam potencial de diferenciação condrogénico, *in vitro* e *in vivo*; só as PDLSC e SCAP não apresentam potencial miogénico, *in vitro* e *in vivo*. Conclui-se então que, em termos de potencial

diferenciador as DPSC, SHED e DFPC são as que apresentam maior variedade na medida em que se diferenciam em todos os tipos celulares testados.

Todas as populações celulares expressam marcadores CD146 e STRO-1; as SHED são as únicas, de entre o grupo, a expressar o marcador embriogénico Nanog; a Nestina, é expressa por todas as populações à exceção das PDLSC, e são apenas expressas pelas SHED após indução; o marcador Notch-1 é expresso exclusivamente pelas DFPC; e o marcador embriogénico Oct-4, é apenas por células pulpares – DPSC e SHED.

## **2.6 Vantagens da utilização de células estaminais da cavidade oral**

As células estaminais são uma ferramenta promissora para a medicina regenerativa e engenharia tecidual graças às suas características proliferativas, capacidade de diferenciação e plasticidade (Bianco & Robey, 2001). Estas células estaminais encontram-se localizadas em nichos, dentro dos tecidos que proporciona o micro ambiente que mantém e regula a sua função (Morrison & Spradling, 2008).

Contudo, o acesso para recolha das células estaminais destes possíveis locais é muitas vezes uma questão limitativa, que acarreta complicações como por exemplo as pós-operatórias (Ahlman et al., 2002; Velchuru et al., 2006). As DPSC representam uma fonte acessível de células estaminais que produz uma morbilidade muito baixa (Pierdomenico et al., 2005).

Outra questão a ter em conta é a natureza das células recolhidas e as suas propriedades funcionais, ou seja, as células devem ser capazes de extensa proliferação a fim de reparar os defeitos macroscópicos e assim representar uma alternativa terapêutica (Bianco et al., 1998).

A extração das células da polpa dentária é de alta eficácia. E além disso as DPSC têm uma grande capacidade de diferenciação.

As DPSC mostraram um perfil de diferenciação semelhante ao que ocorre durante a diferenciação osteogénica (Hwang et al., 2007), tornando-as um modelo interessante no estudo da osteogénese (Liu et al., 2007), bem como demonstraram a sua

enorme capacidade de proliferação *in vitro* (Maher Atari et al., 2012; d'Aquino et al., 2007) e *in vivo* (Graziano et al., 2008).

Outro aspeto importante na utilização de células estaminais na engenharia tecidual é a sua interface com os biomateriais utilizados. Os biomateriais conferem às células utilizadas a arquitetura correta e ajudam a estabelecer os contactos célula-célula e célula-matriz (Horwitz et al., 1999).

As DPSC demonstraram interatividade com biomaterias em estudos *in vitro* (Graziano et al., 2008) e *in vivo* (Graziano et al., 2007; Zhang et al., 2006). No estudo de Zhang et al., foram testados os comportamentos das DPSC isoladas de terceiros molares inclusos, *in vitro* e *in vivo*, em três *scaffolds* 3D: esponja de colagénio, cerâmica porosa e uma malha fibrosa de titânio, sendo que todas as três matrizes proporcionaram aderência, crescimento e diferenciação *in vivo*.

Pela soma das razões supracitadas, as DPSC consagram a sua natureza como fonte autóloga ideal na reconstrução tecidual.

### **3. As células ósseas e o osso da cavidade oral**

#### **3.1 Tipos e funções de células osteogénicas**

“O osso é uma construção biológica incrivelmente forte - tem uma força de tensão equiparável ao ferro, um ponto de rutura entre a madeira e o ferro, não esquecendo o facto de que tem cerca de um terço do peso do ferro” (Garant, 2003).

O osso é um tecido dinâmico, sujeito a constante remodelação em resposta a estímulos mecânicos, nutricionais e hormonais (Matsuura et al., 2014; Garant, 2003). O tecido ósseo em conjunto com a cartilagem reticular fibrosa, o tecido adiposo, sangue e nervos forma o osso, o maior sistema de suporte e proteção de seres vertebrados (Carreira et al., 2014).

As células contituíntes do tecido ósseo são maioritariamente osteoblastos (produtores da matriz osteóide, bem como fatores de crescimento, quimiocinas e

prostaglandinas), osteoclastos (responsáveis pela reabsorção óssea), osteócitos e células limítrofes do osso (Carreira et al, 2014; Garant, 2003).

A vida das células ósseas começa nas células mesenquimais primitivas presentes no estroma da medula óssea, que, através da ativação do gene *Osf2/Cbfa1* que ativa a expressão de osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea e colagénio – preparando a matriz celular – induz a diferenciação destas células em preosteoblastos. Estes, por sua vez, através do contacto com outros preosteoblastos ou com um osteoblasto são induzidos a desenvolver-se em osteoblastos (Garant, 2003).

### **3.2 Matriz celular**

A matriz osteóide é essencialmente constituída por colagénio tipo I, representando este 90% da matriz. Os restantes 10% representam proteínas não colagénicas, proteoglicanas, fatores de crescimento, quimiocinas e reguladores da formação osteoclástica, estas, participam na mineralização da matriz, adesão celular e regulação da atividade celular óssea (Garant, 2003).

De entre alguns componentes ósseos da matriz celular temos a osteocalcina (OC), a sialoproteína óssea, osteopontina (OP), osteonectina (ON) e fatores de crescimento como as BMPs – proteínas morfogénicas ósseas – uma superfamília que atua como potente regulador durante a embriogénese, bem como durante o processo de formação e reparação de cartilagem e osso (Carreira et al, 2014; Garant, 2003).

### **3.3 Características do osso mandibular – diferenças para outros ossos**

Existem diferenças significativas entre os ossos longos e a mandíbula, nomeadamente: na origem do desenvolvimento, na remodelação e turnover ósseo, no potencial osteogénico e no conteúdo em colagénio (Matsuura et al., 2014).

O “turnover” do osso mandibular e a remodelação óssea é mais rápida na mandíbula que em qualquer outro osso do esqueleto humano (Huja, Fernandez, Hill & Y. Li, 2006).

O potencial osteogénico das células estaminais mesenquimais da mandíbula, em comparação com as mesmas células da crista ilíaca ou outros ossos longos é maior (Matsubara et al., 2005; Aghaloo et al., 2010).

Em comparação com os ossos longos, a mandíbula tem um conteúdo superior em colagénio I, menor quantidade de ligações cruzadas, e menor extensão de hidroxilações de lisina. A grande abundância de ligações cruzadas imaturas no colagénio mandibular, é sugestiva de um taxa menor de maturação. Isto significa que o colagénio mandibular é relativamente imaturo, e como tal, mais apto a degradação e turnover metabólico (Saito & Marumo, 2010).

### **3.4 Regeneração óssea**

O osso possui a capacidade intrínseca de regeneração como parte integrante do processo de reparação em resposta à lesão, ou durante o desenvolvimento esquelético e remodelação óssea contínua ao longo da vida (Dimitriou et al., 2011).

A regeneração óssea é um conjunto de processos biológicos de osteoindução e osteocondução, envolvendo várias células e vias de sinalização intra e extracelulares, numa sequência temporal e espacial definida, com o objetivo de otimizar a reparação do esqueleto e restaurar uma função ótima (Dimitrou et al, 2011).

Ainda que o osso detenha a capacidade inata de auto-cura, existem situações clínicas nas quais a regeneração fisiológica não é suficiente – situações em que a regeneração é necessária em grandes zonas, em reconstrução esquelética ou grandes defeitos ósseos causados por trauma, infeção, resseção tumoral (Dimitrou et al, 2011).

Desta forma, são necessários outros métodos, outras abordagens, a fim de refazer o osso e restituir a função perdida.

As abordagens atuais na reparação de defeitos ósseos alveolares incluem, enxerto ósseo, regeneração óssea guiada e distração osteogénica (Aghaloo & Moy, 2007).

O enxerto autólogo é considerado o *gold standard* na regeneração óssea, contudo apresenta várias desvantagens, como a indisponibilidade em grandes defeitos e complicações relacionadas com o dador (Liu et al., 2008).

O osso autógeno a enxertar, pode ser recolhido de várias localizações intra e extra-orais. Quando é necessária grande quantidade de osso, o local de eleição para recolha é a crista ilíaca, contudo, a recolha de osso desde nicho está associada a elevada morbilidade e complicações pós-operatórias – dor, infeção, fratura, hemorragia. A fim de colmatar estes problemas, e evitar tais complicações, utilizam-se enxertos alógenos – osso recolhido, tratado e armazenado de cadáveres ou dadores vivos (Salvado, 2007).

#### **4. Regeneração óssea com células estaminais da polpa dentária**

##### **4.1 Engenharia Tecidual**

A engenharia tecidual (TE, do inglês *Tissue Engineering*), é uma área da ciência contemporânea, que junta os princípios da biologia celular, biologia do desenvolvimento e a ciência dos biomateriais, a fim de desenvolver novos procedimentos e biomateriais que substituam os tecidos perdidos ou danificados (Narem & Sambanis, 1995; Langer & Tirrell, 2004).

Os requisitos base para a produção de um tecido são: células progenitoras, moléculas de sinalização, uma matriz extracelular ou um portador (uma *scaffold*), e um aporte sanguíneo adequado que promova a vascularização do tecido transplantado (Slavkin & Bartold, 2000).

As células utilizadas na engenharia tecidual são células estaminais já foram aplicadas em diversas situações clínicas para a reparação e/ou regeneração de tecido imperfeito/defeituoso em órgãos como o osso (Horwitz et al., 2005).

No contexto da regeneração óssea, os requisitos para a TE envolvem células precursoras de osso (osteoblastos) e moléculas osteoindutoras (como BMPs), incorporadas num *scaffold* tridimensional artificial e sua subsequente implantação no defeito em questão (Bartold, McCulloch, Narayanan & Pitaru, 2000).

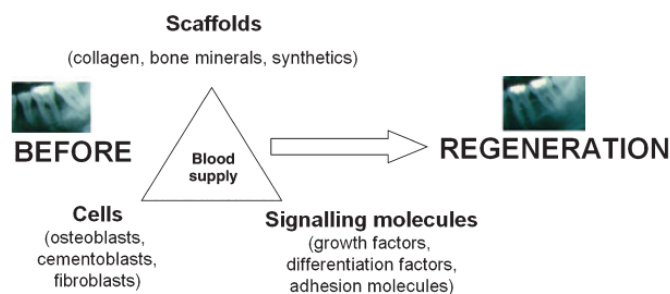


Figura 3: Esquema representativa da TE aplicada à regeneração óssea da cavidade oral, adaptado de Wiley, 2009.

Vários estudos *in vitro* já provaram o potencial osteogénico de células estaminais da cavidade oral (Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003; Seo et al., 2004; Morsczeck et al., 2005; Sonoyama et al., 2006; Li et al., 2011).

Por representar uma fonte acessível e facilmente diferenciável, a curiosidade pelas DPSC cresceu e levou a vários estudos desde a sua caracterização *in vitro* (Li et al., 2011; Graziano et al., 2007), e em estudos *in vivo*, na formação de tecido ósseo em modelos experimentais animais (Laino et al., 2005; R d'Aquino et al., 2007).

A curiosidade nasceu então sobre se as DPSC seriam candidatas a regeneração de defeitos ósseos, na cavidade oral, em estudos *in vivo*.

#### 4.2 Estratégia de Pesquisa

Foi realizada uma pesquisa electrónica, em inglês, de artigos científicos, nas bases de dados PubMed e B-On, sem restrições, sob os termos “bone regeneration”, “oral bone regeneration”, “dpsc bone regeneration”, “stem cells maxillofacial bone regeneration” e “stem cells bone regeneration”.

Os critérios de inclusão e exclusão dos estudos foram, numa primeira análise a leitura de título e resumo de cada artigo, e, numa segunda análise, leitura integral do artigo, com especial relevância nos seguintes pontos: fonte de células estaminais, portador celular, modelo experimental *in vivo*, tipo de defeito a regenerar, método de avaliação da regeneração óssea e resultados obtidos.

Com base nestes tópicos foram encontrados cinco artigos. Três dos quais realizados em modelo experimental animal, e dois em modelo experimental humano, sendo que, o segundo destes últimos não representa o estudo em si mas um follow-up



três anos depois da execução do primeiro.

Abaixo, apresento a revisão dos cinco estudos sobre regeneração óssea de defeitos mandibulares com células estaminais da polpa dentária.

### **4.3 Regeneração óssea de defeitos mandibulares com células da polpa dentária: modelo experimental animal**

#### **4.3.1 Revisão do estudo realizado por Zheng *et al.*, no ano de 2009, intitulado “Stem Cells from Deciduous Tooth Repair Mandibular Defect in Swine”**

##### **Objectivo do estudo**

Testar a eficácia de células estaminais da polpa dentária de dentes decíduos de suíno, de fonte autóloga, na regeneração de defeitos ósseos mandibulares criados no mesmo.

##### **Materiais e Métodos**

1. Colheita das DPSC de dentes decíduos de suíno;
2. Isolamento e caracterização das DPSC – análise imunocitoquímica e análise citométrica de fluídos;
3. Cultura das DPSC em portadores  $\beta$ -TCP ( *$\beta$ -Tricalcium Phosphate* – Fosfato  $\beta$ -Tricálcico);
4. Construção de defeito ósseo alveolar na mandíbula dos suínos: defeito maior criado em 10 modelos para um follow-up a longo prazo de 24 semanas afim de avaliar a regeneração óssea, e, criação de 2 defeitos menores, bilaterais, em 6 modelos para follow-up a curto prazo de 2 e 4 semanas;
5. Execução da tomografia computadorizada (TC) às 2, 4, 12 e 24 semanas pós-enxerto;
6. Sacrifício dos animais e colheita de amostras para análise histológica;
7. Análise de resultados.

##### **Resultados**

A análise da TC revelou a quase completa regeneração dos defeitos, com

formação de novo osso, no grupo DPSC/ $\beta$ -TCP, nos cortes coronal e axial.

A análise histológica revelou formação de osso lamelar no grupo DPSC/ $\beta$ -TCP, em contraste com o controlo  $\beta$ -TCP, sem células pulpares, cuja matriz ficou parcialmente degradada e o defeito foi apenas parcialmente regenerado.

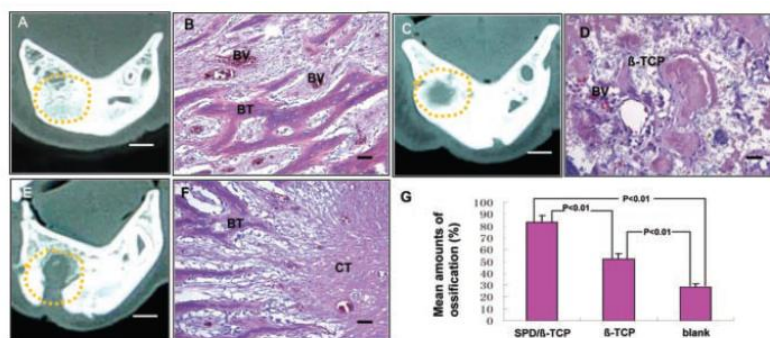


Figura 4: Análises TC e Histológica; **A/B)** grupo DPSC/ $\beta$ -TCP: CT (A) demonstrou regeneração ocorrida no defeito ao fim das 24 semanas; delimitação a amarelo indica o defeito original; a secção histológica (B) demonstrou formação de osso novo; **C/D)** grupo  $\beta$ -TCP: CT demonstrou pequeno defeito ósseo remanescente no local de reconstrução; secção histológica (D) demonstrou que o defeito ficou parcialmente preenchido com tecido conjuntivo, *scaffold*  $\beta$ -TCP e novo osso; **E/F)** grupo controlo: a TC demonstrou regeneração óssea limitada e o defeito por preencher; a secção histológica (F) demonstrou que o defeito ficou preenchido com tecido conjuntivo; **G)** análise da formação óssea – demonstrou um aumento significativo na formação de matriz mineralizada no defeito regenerado. Adaptado de Zheng et al., 2009.

## Conclusões

Este estudo foi o primeiro a comprovar a capacidade de regeneração de defeitos ósseos orofaciais pelas DPSC, num modelo animal grande, podendo estas células estaminais servir de alternativa na reconstrução óssea de defeitos ósseos alveolares e orofaciais.

### 4.3.2 Revisão do estudo realizado por Liu *et al.*, no ano de 2010, intitulado “Reconstruction of Alveolar Bone Defects Using Bone Morphogenetic Protein 2 Mediated Rabbit Dental Pulp Stem Cells Seeded on Nano-Hydroxyapatite/Collagen/Poly(L-lactide)”

## Objetivo do estudo

Avaliar a capacidade de um complexo constituído por - BMP-2 humana recombinante e DPSC (rhBMP-2/DPSC), de fonte autóloga, numa matriz de nano-hidroxiapatite/colagénio/poli-L-láctido (nHAC/PLA) – na reconstrução de defeitos ósseos alveolares mandibulares em coelhos New Zealand.

## Materiais e Métodos

1. Colheita das DPSC de coelho; expansão *ex vivo* em meio de cultura;
2. Avaliação da diferenciação das DPSC – no prato de cultura e na *scaffold* nHAC/PLA;
3. Construção de defeito ósseo alveolar na mandíbula dos coelhos;
4. Tratamento dos defeitos criados com: nHAC/PLA, nHAC/PLA + rhBMP-2, nHAC/PLA + DPSC, nHAC/PLA + rhBMP-2 + DPSC e, num último grupo, osso autólogo recolhido da crista ilíaca;
5. Execução de exame radiológico e rotulagem com marcação fluorescente policrómica sequencial;
6. Sacrifício dos animais para recolha de amostras 12 semanas após o procedimento cirúrgico, e sua posterior análise histológica e histomorfométrica.

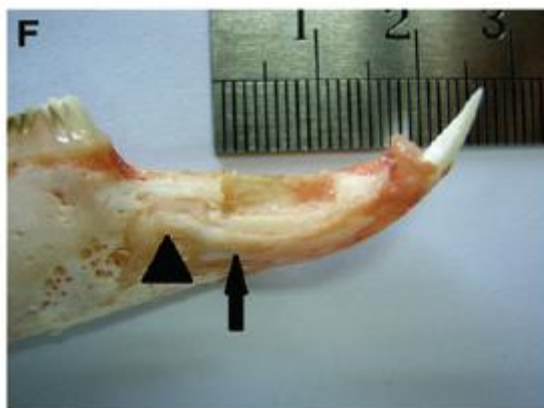


Figura 5: Fotografia representativa do defeito alveolar criado, adaptado de Liu et al., 2011.

## Resultados

A análise dos exames radiográfico, histológico e histomorfométrico revelaram que no tratamento com nHAC/PLA + DPSC + rhBMP-2 ocorreu maior formação de osso e a mineralização ocorreu mais cedo, do que nos grupos com tratamentos com nHAC/PLA, nHAC/PLA + rhBMP-2, nHAC/PLA + DPSC, e até do osso autólogo.

A aplicação de rhBMP-2 serviu como fator osteopromotor das DPSCs e o complexo nHAC/PLA serviu como *scaffold* ótimo na dispersão, proliferação e diferenciação das DPSC.

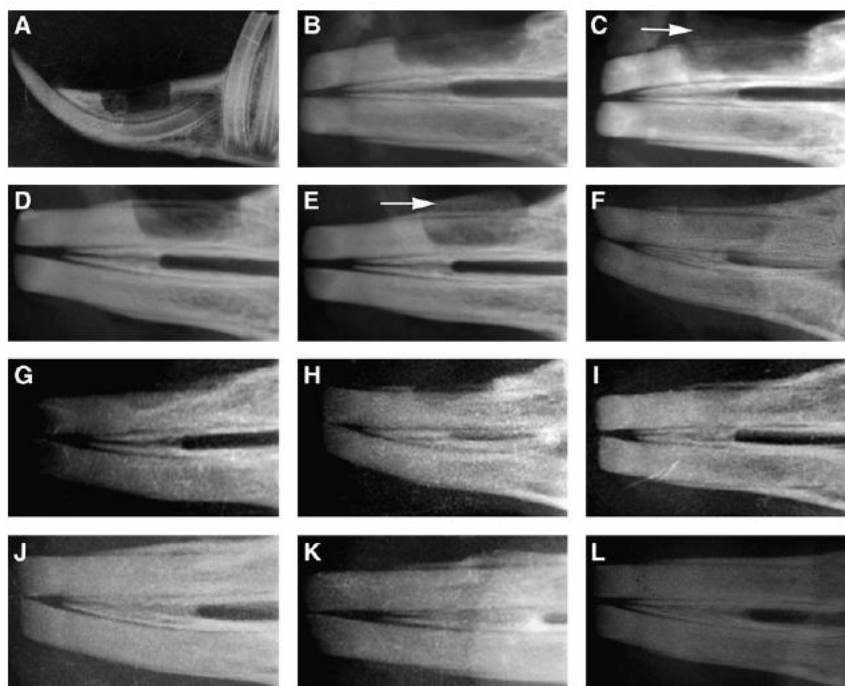


Figura 6: Radiografias do defeito; aparência do defeito alveolar das 0 às 12 semanas de A a L. Adaptado de Liu et al., 2011.

## Conclusões

Foi demonstrado que:

1. As DPSC, embriologicamente derivadas da crista neural e sendo tecidualmente semelhantes às células ósseas mandibulares, serviram como boa fonte para regeneração de defeitos ósseos alveolares;
2. A rhBMP-2 conseguiu osteoinduzir a cultura de DPSC na matriz nHAC/PLA;
3. A matriz nHAC/PLA suportou a proliferação e diferenciação das DPSC, integrá-las no osso alveolar, e poderá ser utilizada como bom *scaffold* na regeneração óssea alveolar.

Em suma, o complexo nHAC/PLA + DPSC + rhBMP2 pode ser uma alternativa viável ao enxerto de osso autólogo na reconstrução de defeitos ósseos.

#### **4.3.3 Revisão do estudo realizado por Yamada *et al.*, no ano de 2011, intitulado “Promising Cell-Based Therapy for Bone Regeneration Using Stem Cells From Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Bone Marrow”**

##### **Objectivo do Estudo**

Examinar o potencial das células estaminais autólogas de canídeo – MSC (da medula óssea), DPSC e DTSC (*deciduous tooth stem cells*, células estaminais de dentes decíduos), recorrendo ao plasma rico em plaquetas (PRP) como *scaffold* autóloga – em defeitos ósseos mandibulares, num modelo experimental de cão.

##### **Materiais e Métodos**

1. Exodontia de primeiros molares, segundos e terceiros pré-molares;
2. Criação dos defeitos mandibulares com um diâmetro de 10 mm; os defeitos criados foram: 1) controlo, 2) plasma rico em plaquetas, 3) MSC/PRP, 4) DPSC/PRP, 5) DTSC/PRP;
3. Cultura das células recolhidas com suplementos para indução de osteogénese, entre os quais – fatores de crescimento derivados do plasma (PDGF), fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento tipo-insulina-I (IGF-I);
4. Preparação do plasma rico em plaquetas (PRP);
5. Injeção das células nos defeitos criados;
6. Análise dos resultados histológicos e histomorfométricos.

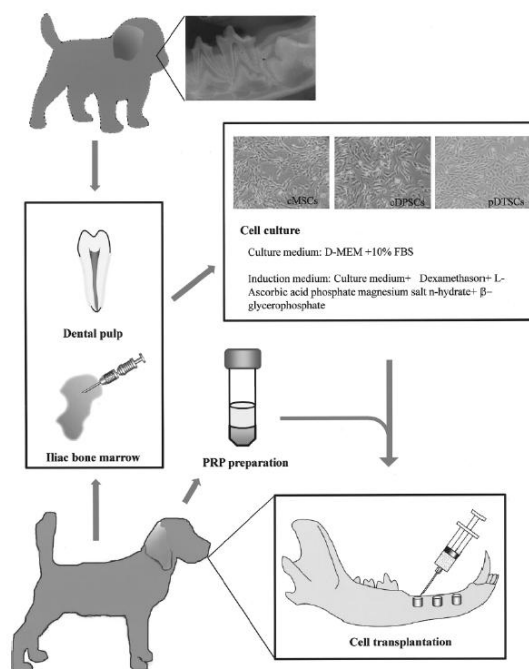


Figura 7: Esquema experimental do protocolo seguido. Adaptado de Yamada et al., 2011.

## Resultados

As análises macroscópicas/clínicas revelaram ter havido regeneração dos defeitos nos grupos MSC/PRP, DPSC/PRP e DTSC/PRP, houve formação de osso novo com osteócitos ativos após 4 semanas, e formação de osso maduro com uma estrutura lamelar e cavidade medular abundante após 8 semanas; a formação de osso no grupo DTSC/PRP foi mais fraca em comparação com os outros dois grupos onde houve formação óssea. No grupo controle PRP apenas, a regeneração não foi completa, estava presente alguma formação óssea com tecido fibroso que se manteve igual às 2, 4 e 8 semanas.

A análise imunohistológica revelou resultados positivos para osteoblastos e tecidos mineralizados nos grupos MSC/PRP e DPSC/PRP, e resultados positivos para osteocalcina – um marcador específico para a osteogênese - no grupo DTSC/PRP, 8 semanas após implantação. Não foram detectados quaisquer resultados positivos, para esta análise, no grupo controle PRP.

A análise histomorfométrica revelou não ter havido grande aumento da área regenerada medular e cortical no grupo controle PRP. Os outros grupos demonstraram aumento significativo na área regenerada comparados com o controle, confirmando assim as amostras histológicas, não tendo, contudo, havido diferenças significativas de

formação óssea entre os três grupos contendo DPSC.

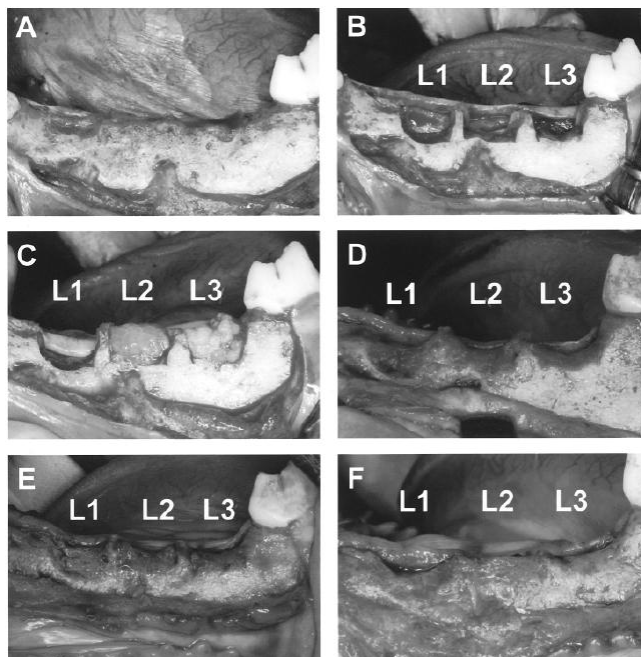


Figura 8: Fotografias da análise macroscópica da regeneração ocorrida; A) mandíbula cicatrizada pós-exodontias; B) Defeito preparado; C) Representação dos grupos L1 – defeito, L2 – MSC/PRP, L3 – DTSC/PRP; D) Regeneração ocorrida ao fim de 2 semanas; E) Controle da regeneração a 4 semanas; F) Controle da regeneração a 8 semanas. A regeneração foi completa até à altura óssea normal, mas não no controle. Adaptado de Yamada et al., 2001.

### Conclusões

Os autores concluíram que as DPSC e DTSC conseguiram uma formação óssea, idêntica às MSC da medula óssea, através de um processo de regeneração natural.

Os enxertos utilizados não provaram haver reações de rejeição aos mesmos.

Assim, as DPSC e DTSC representam potenciais fontes de células estaminais para regeneração óssea em várias cirurgias ósseas como nomeadamente maxilofacial, plástica, anomalias craniofaciais e ortopédica.

#### 4.4 Regeneração óssea de defeitos mandibulares com células da polpa dentária: modelo experimental humano

##### 4.4.1 Revisão do estudo realizado por R d'Aquino *et al.*, no ano de 2009 intitulado “Human Mandibule Bone Defect Repair by

## **the Grafting of Dental Pulp Stem/Progenitor Cells and Collagen Sponge Biocomplexes”**

### **Objectivo**

O objectivo do presente estudo foi a reparação de defeitos ósseos alveolares secundários à exodontia de terceiros molares inclusos, com recurso à disposição de DPSC em *scaffolds* de esponjas colagénio.

### **Seleção e preparação de doentes**

Os critérios de inclusão de doentes na amostra foram os seguintes:

1. Necessidade de exodontia para todos os terceiros molares, com situação de inclusão idêntica nos dois terceiros molares inferiores;
2. Ausência de doenças sistémicas;
3. Exclusão de gestantes (doentes sexo feminino);
4. Sem hábitos de consumo de drogas.

A necessidade de similitude de posição relativamente aos dentes inferiores, deve-se ao facto de, ser necessário para o estudo utilizar um lado como local teste (T) e, o lado oponente, como local controlo (C).

Dos cem doentes abordados, dezassete aceitaram a participação no estudo, e apenas sete destes (seis do sexo feminino e um do sexo masculino) voltaram após um ano para follow-up.

Os doentes foram sujeitos a uma consulta de higiene oral uma semana antes da cirurgia. Foram instruídos na correta higiene oral quotidiana, que consistiu em bochechos com clorohexidina (CHX) a 0,2% após escovagem dentária, duas vezes por dia até à realização da cirurgia.

### **Avaliação pré-cirúrgica das células estaminais/percursoras da polpa dentária**

Previamente à cirurgia de regeneração óssea, foi feita a colheita das células estaminais da polpa dentária dos doentes.

Os doentes foram sujeitos à exodontia dos terceiros molares superiores (maxilares).



O protocolo para colheita das células da polpa dentária de terceiros molares superiores, foi como descrito pelo mesmo autor em 2007, num estudo sobre a capacidade de diferenciação das DPSC em osteoblastos e endoteliócitos. Foi efetuada lavagem do dente numa solução de clorohexidina a 0,2%, abertura da câmara pulpar com recurso a broca de turbina e colheita da polpa.

Seguiu-se o tratamento da polpa, para a preparar as células para a cultura celular. O protocolo utilizado foi o mesmo que Graziano *et al.* em 2008 definiram, num estudo sobre a produção *in vivo* de nódulos ósseos por células estaminais a expressar o marcador CD34+. A polpa foi lavada numa solução salina de 1,5 ml e mecanicamente dissociada.

O passo a seguir foi a cultura das células. O protocolo utilizado foi o seguinte:

1. Filtragem das células num passador de 70 micrómetros;
2. Colocação de novo em meio de cultura, duas vezes por semana, com:
  - Meio minimamente essencial  $\alpha$  (CAMBREX, CHARLES CITY, IA USA)
  - 20% FBS (Invitrogen, San Giuliano, Milanese Italy)

Ao vigésimo primeiro dia, as células foram separadas e analisadas num Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS Vantage, Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), para procura de antígenos expressos pelas células.

µPara separação das células do meio de cultura, procedeu-se da seguinte forma:

1. Solução de EDTA a 0,02%;
2. Centrifugação;
3. Incubação durante uma hora a 4°C, com:
  - 1 µl de anticorpos – anti-CD34 e anti-flk-1;
  - 100 µl de PBS – solução salina fosfatada tamponada;

### **Exodontia de terceiros molares inclusos inferiores**

Os doentes foram preparados para a cirurgia com desinfeção da cavidade oral com um bochecho de clorohexidina 0,2%.

Procedeu-se à exodontia de terceiros molares inferiores inclusos de acordo com um procedimento padrão:

1. Incisão horizontal na gengiva até ao periósteeo;
2. Descolamento da membrana muco-periosteá;
3. Osteotomia do osso envolvente com broca esférica e irrigação externa com uma solução salina, até exposição da coroa dentária;
4. Exodontia;
5. Regularização do rebordo ósseo;
6. Irrigação com solução salina;
7. Alisamento radicular da raiz distal do segundo molar inferior, remoção de todo o tecido necrótico;
8. Injeção das células estaminais/progenitoras obtidas numa esponja de colagénio (o *scaffold* escolhido);
9. Colocação da esponja de colagénio no alvéolo pós-extração – local teste (T); Colocação de uma esponja de colagénio no alvéolo pós-extração no local controlo (C);
10. Sutura.

Foram descritas exceções ao ponto 3 ao procedimento cirúrgico-base acima descrito. São as seguintes:

1. Quando não foi possível a exodontia do dente por inteiro, foi feito um sulco vertical em relação ao longo eixo do dente (LED) ao nível da linha cervical, com uma broca de fissura diamantada, a fim de separar a coroa da raiz;

- O sulco criado na coroa não pode ser muito profundo, já que o canal mandibular se encontra próximo do dente em questão e o risco de lesão do nervo alveolar inferior;
- Uma vez feito o sulco, colocou-se uma alavanca (straight elevator) a fim de separar a coroa das raízes com um movimento rotatório;
- A coroa é removida separadamente, com a mesma alavanca, com um movimento rotatório para cima;
- Quando o dente apresentou múltiplas raízes, a coroa foi removida conforme supra descrito; uma vez separadas as raízes, durante a secção coronária, foram facilmente removidas em sucessão, de distal para mesial.

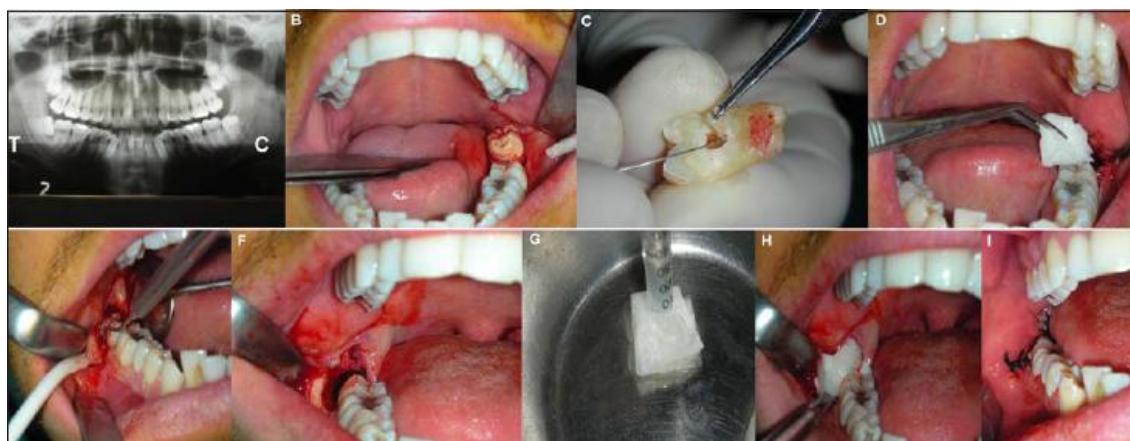


Figura 9: Procedimento cirúrgico; A) raio-x pré operatório, é possível ver como o terceiro molar incluído está em contacto próximo com a raiz do segundo molar; B) Local controle; C) Remoção polpa; D) Implantação esponja de colagénio sem DPSC no local C; E) Medição da profundidade do defeito criado pela exodontia no local T; F) Local T, pós-cirúrgico; G) Produção do biocomplexo da esponja de colagénio; H) Enxerto do biocomplexo no defeito; I) Sutura. Adaptado de Aquino et al., 2009.

### **Avaliação pós-cirúrgica do doente**

A avaliação pós-cirúrgica foi executada a partir de observação clínica e radiológica.

Os controlos feitos foram: sete dias após a cirurgia, mensalmente até três meses e um ano após a cirurgia. Em todos os controlos foi feito exame radiográfico e

observação clínica.

O primeiro controlo ao sétimo dia após a cirurgia consistiu em exame radiográfico, observação clínica e remoção de sutura. Foram avaliados o edema, o grau de inflamação e a funcionalidade.

No quarto controlo, três meses pós-cirúrgico e antes da avaliação do osso formado, foram feitas profundidades de sondagem a fim de avaliar os resultados obtidos.

Foi então colhida uma amostra de ambos os locais – C e T – para análise histológica e de imunofluorescência (IF).

Para a análise de imunofluorescência foram utilizados os anticorpos: anti-osteocalcina (OC), anti-osteonectina (ON), anti-fosfatase alcalina óssea (BAP), anti-proteína morfogénica óssea (BMP)-2 e anti-fator de crescimento endotelial (VEGF).

Um ano após a cirurgia, as análises supracitadas foram refeitas.

## **Resultados**

Os controlos foram feitos com base em exame clínico e radiográfico, e colheita de amostras de osso para posterior análise histológica e imunofluorescente (IF).

Os controlos foram realizados ao sétimo dia após a cirurgia, mensalmente até três meses e um ano após a cirurgia.

## **Resultados do Exame Clínico**

As DPSC colhidas dos terceiros molares maxilares demonstraram forte positividade para CD34 e Flk-1, mostrando claramente serem células estaminais progenitoras e em quantidade suficiente para a execução do estudo *in vivo*.

Sete dias após o implante do biocomplexo – *scaffold* de esponja de colagénio + células estaminais/progenitoras – a observação clínica e radiológica revelou não haver diferenças no local T ou C. De um modo geral, os doentes apresentaram edema e inflamação no local da cirurgia, mas nenhum apresentou infeção pós-cirúrgica.

Em todos os casos o tempo de recuperação foi considerado normal.

Não houve queixas de dor pós-operatória em particular, como tal não foi administrada medicação analgésica.

O exame funcional revelou o bem-estar de todos os doentes à exceção de um que apresentou pequena distorção na abertura de boca, e maior nível de edema em ambos locais.

A observação pós-operatória revelou cicatrização normal sem a formação de tecido de cicatrização ou distúrbios funcionais; não foram reportados casos de sangramento, edema grave ou outros efeitos secundários.

Do primeiro controlo, ao sétimo dia pós-cirurgia, ao quarto, três meses pós-cirurgia, nenhum doente demonstrou sinais de infeção local ou generalizada. A funcionalidade – dentária, mastigação em particular – e qualidade de vida foram ótimas em todos os casos; todos os parâmetros – orais e gerais – estavam dentro da normalidade.

Trinta dias após a cirurgia, os parâmetros clínicos estavam dentro da normalidade.

### **Análise Radiológica**

Os controlos radiográficos demonstraram diferenças significativas nos dois locais C e T, sendo que o último apresentou maior taxa de mineralização.

Dois meses após a cirurgia, não estavam presentes quaisquer alterações. A análise radiológica revelou níveis diferentes de cortical óssea no local T e C; no local T a margem cortical atingiu o nível junção amelo-cimentária (JAC) do segundo molar inferior (adjacente), demonstrando assim regeneração vertical do defeito; o mesmo não foi observado no local C em qualquer doente da amostra.

Três meses após a cirurgia, a análise radiográfica confirmou completa regeneração no local T, com uma cortical óssea superior ao local C.

A análise da profundidade de sondagem revelou um aumento na quantidade de periodonto, quantitativamente superior no local T que no local C: enquanto que o local C apresentou um aumento/ganho de  $4,4 \pm 1,2$  mm, no local de T o ganho/aumento foi de  $6,3 \pm 2,3$  mm.

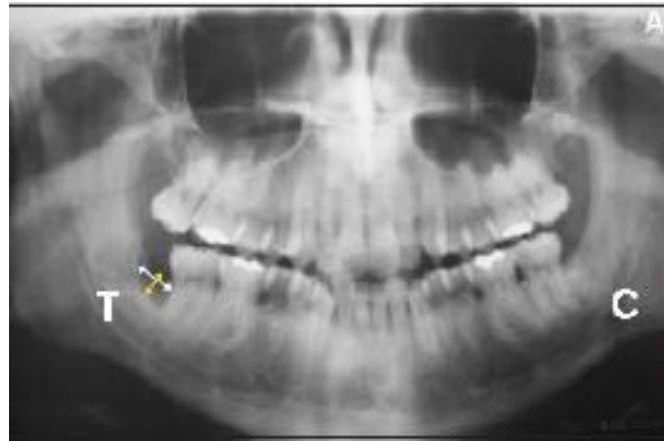


Figura 10: Radiografia de controle, 7 dias após intervenção cirúrgica. Adaptado de Aquino et al., 2009.



Figura 11: Radiografia de controle, 30 dias após intervenção cirúrgica; é evidente no local T a iminente regeneração. Adaptado de Aquino et al., 2009.

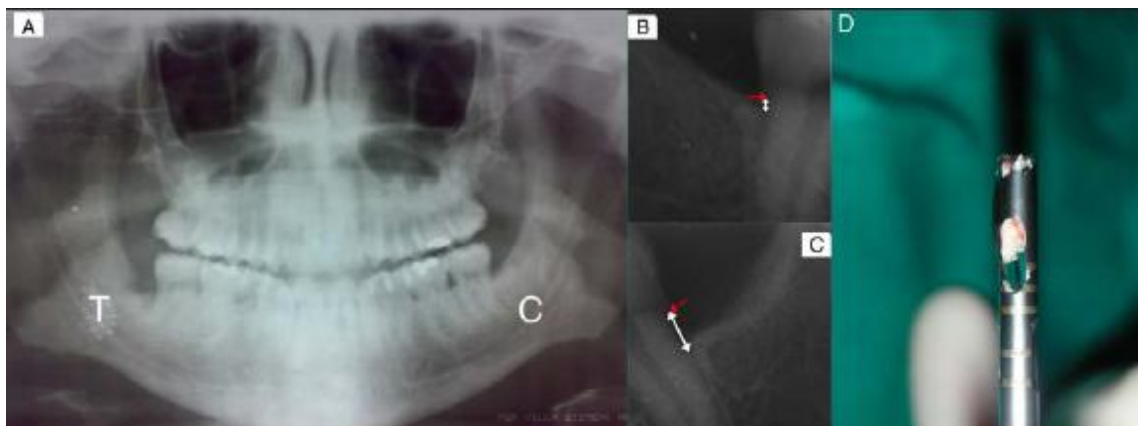


Figura 12: Radiografia de controle, 3 meses após intervenção (A); maximização raio-x local T (B); maximização raio-x local C, a pinta vermelha indica a JAC (C); Colheita de osso para análise. Adaptado de Aquino et al., 2009.

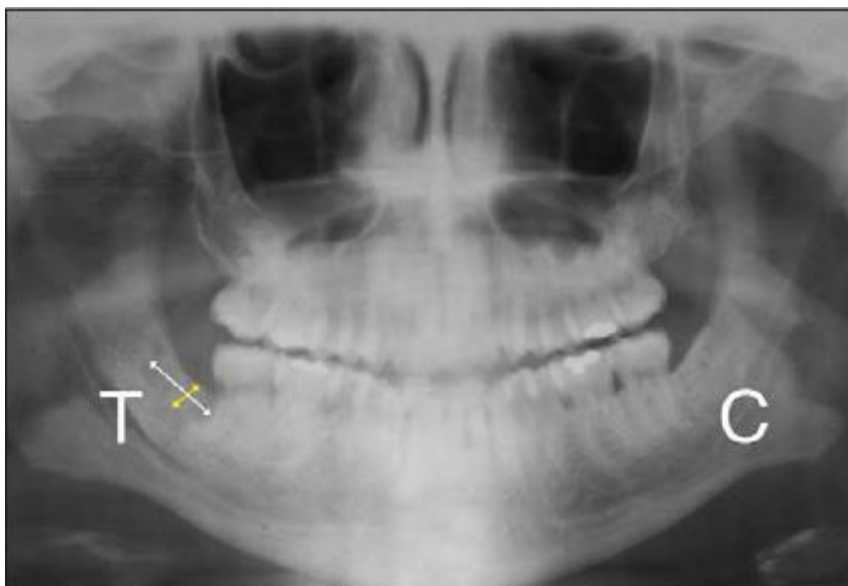


Figura 13: Radiografia de controle, um ano após intervenção. Evidência da regeneração de osso. A seta amarela indica o aumento de osso vertical ganho com a regeneração. Adaptado de Aquino et al., 2009.

### **Análise Histológica**

Em ambos locais C e T, a esponja de colagénio foi totalmente reabsorvida.

As amostras do local T, revelaram uma arquitetura óssea lamelar a circundar os canais Haversianos, bem organizada e bem vascularizada.

As amostras do local C, revelaram a formação de um osso imaturo, com osso fibroso armadilhado/aprisionado entre a nova estrutura lamelar, canais de Havers grandes e incompletos e evidência de reabsorção óssea.

### **Análise Imunofluorescente**

A análise imunofluorescente teve o intuito de confirmar a expressão das proteínas ósseas – ON, OC e BAP – bem como BMP-2 e VEGF.

Tanto na amostra T como C, as proteínas ON, OC e BAP foram expressas, contudo com distribuição diferente – a tabela abaixo sumariza a sua expressão.

Relativamente à expressão de BMP-2 e VEGF, os seus níveis de expressão foram superiores na amostra T em relação à amostra C.

## **Conclusões**

Os enxertos produzidos pela esponja de colagénio + DPSC, produziram uma regeneração óssea rápida, com uma quantidade e qualidade ótimas, quando comparadas com as técnicas standard utilizadas para regeneração óssea guiada e outro tipo de enxertos.

Foi demonstrado o seguinte:

1. As DPSC podem ser utilizadas em reparação óssea oral e maxilofacial;
2. A utilização de DPSC em *scaffolds* reabsorvíveis apropriados produz um biocomplexo eficiente;
3. As esponjas de colagénio podem ser consideradas um suporte óptimo para células estaminais/progenitoras em regeneração guiada por células.

### **4.4.1 Revisão do estudo realizado por Giuliano *et al.*, no ano de 2013 intitulado “Three Years After Transplants in Human Mandibles, Histological and In-Line Holotomography Revealed that Stem Cells Regenerated a Compact Rather than a Spongy Bone: Biological and Clinical Implications”**

## **Objetivo do estudo**

O objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade e qualidade de osso regenerado, e da rede vascular criada, 3 anos após a intervenção do enxerto. A análise foi feita através dos métodos convencionais – observação clínica e exame radiológico – e holotomografia baseada em radiação síncontron - SR-HT).

## **Materiais e Métodos**

1. Exame clínico e radiográfico;
2. Recolha de amostras de osso dos locais T e C;
3. Análise histológica dos resultados;
4. Análise com SR-HT.

## **Resultados**

A partir da observação de resultados concluiu-se que nos locais enxertados, o



tecido regenerado era composto por osso completamente compacto, com uma densidade de matriz superior à observada no local controle do mesmo doente - que apresenta uma estrutura de osso esponjoso alveolar.

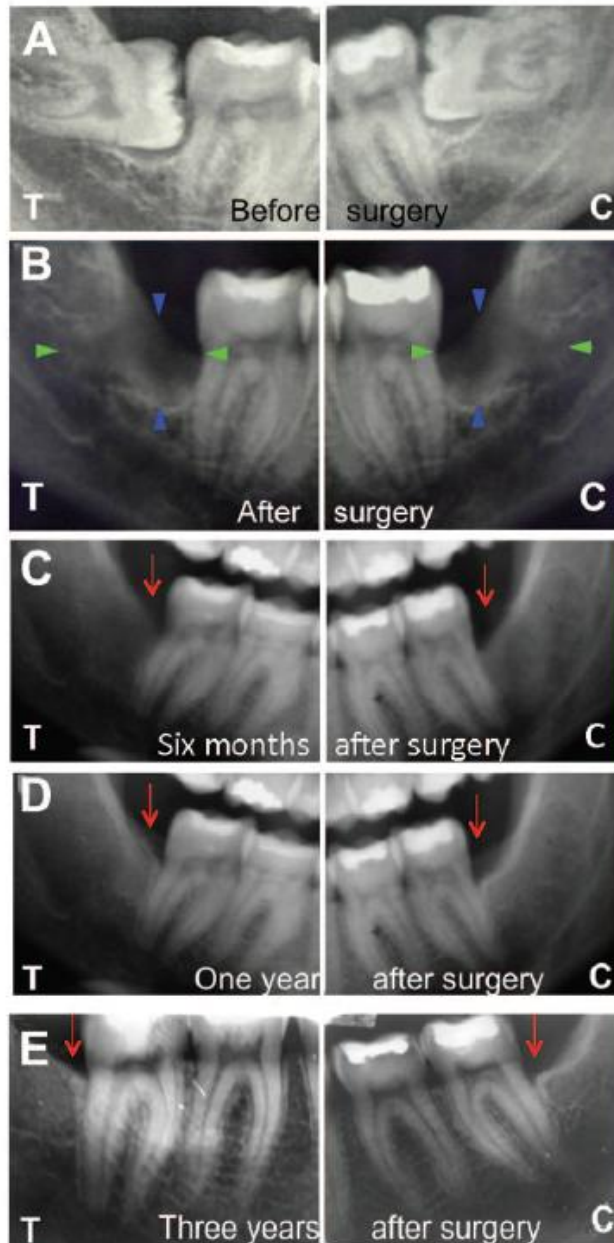


Figura 14: Radiografias dos locais T e C de um doente antes da cirurgia (A) e controlos – pós-cirúrgico (B), 6 meses (C), 1 ano (D) e 3 anos (E), adaptado de Giuliani et al., 2013.

## **Conclusões**

Foi demonstrado o seguinte:

1. O biocomplexo DPSC + esponja colagénio repara osso com sucesso;
2. 3 anos após o transplante, a SR-HT mostrou que o osso regenerado é amplamente vascularizado e qualitativamente de tipo compacto, em vez de esponjoso;
3. Provavelmente, a regeneração de osso compacto ocorreu porque as DPSC não seguem a sinalização local do osso esponjoso circundante.

AUTOR	MODELO EXPERIMENTAL	FONTE CÉLULAS ESTAMINAIS	PORTADOR/MEIO DE CULTURA	DEFEITO	MÉTODO DE AVALIAÇÃO	TEMPO DE AVALIAÇÃO	RESULTADOS
Yamada et al.	Cão	BMSC, DPSC, DTSC – canídeo	PRP	Defeito ósseo mandibular	Histologia, Histomorfometria, IHC	2, 4 e 8 semanas	Nos grupos com células ocorreu maior regeneração óssea que nos grupos controle, mas não significativamente diferente entre os tratamentos contendo células
Liu et al.	Coelho	DPSC – coelho	nHAC/PLA com ou sem DPSCs/rhBMP-2	Defeito ósseo alveolar segmentado	RX, Histologia, Histomorfometria	12 semanas	Formação normal de osso e osteoblastos activos e tecido osteóide no aparato histológico. A posição óssea mineral significativamente maior nos grupos nHAC/PLA + DPSC + rhBMP-2. A densidade do RX no grupo nHAC/PLA + DPSC + rhBMP-2 é compatível com osso intacto
Zheng et al.	Porquinho (minipig)	DPSC – suíno	TCP	Defeito ósseo mandibular	TC, Histologia, Histomorfometria	24 semanas	Regeneração óssea quase completa do defeito no grupo DPSC/TCP. Regeneração óssea no tratamento com DPSC/TCP significativamente superior ao tratamento do grupo controle
R d'Aquino et al.	Humano	DPSC – humanas	Esponja de colagénio	Defeito alveolar pós-exodontia de terceiros molares incluídos mandibulares	RX, Observação clínica, Histologia e IF	7 dias, mensalmente até 3 meses, 1 ano	Regeneração óssea completa do defeito à altura da JAC com presença de canais de Havers definidos e arquitectura lamelar, em contraste com os controles que apresentaram uma formação óssea imatura
Gruliani et al.	Humano	DPSC – humanas	Esponja de colagénio	Defeito alveolar pós-exodontia de terceiros molares incluídos mandibulares	RX, Observação clínica, Histologia, Histomorfometria, SR-HT	3 anos	Melhor altura óssea no defeito aos 3 anos. Presença de canais de Havers no defeito em contraste com a arquitectura lamelar interrompida nos controles

Tabela 2: Tabela resumo dos estudos apresentados referendo autor, modelo experimental, fonte celular, portador/*scaffold*, tipo de defeito, método de avaliação, tempo de avaliação e resu

### III. CONCLUSÃO

Relativamente aos estudos apresentados, podemos concluir a eficácia das DPSC como regenerador ósseo *in vivo*.

As DPSC são uma fonte acessível, versátil e de fácil manuseio, de células progenitoras osteoblásticas, que provaram ser capazes de regenerar osso *in vivo* em modelos experimentais animais e humano.

A aplicação das DPSC na regeneração óssea em Medicina Dentária, e quem sabe na medicina regenerativa de um modo geral, representa o futuro; não só por constituir uma fonte autóloga de enxerto, mas pela sua acessibilidade, baixo risco, fácil expansão e reprodutibilidade em comparação com outras fontes autólogas mais complexas de trabalhar.

A investigação na área e os estudos publicados são ainda escassos e contam com muita variabilidade de métodos usados, o que torna difícil uma conclusão precisa, relativamente à qualidade de osso formado por exemplo, ou resposta dos sujeitos à intervenção, já que o número das amostras é muito pequena.

Ainda que os primeiros trabalhos de investigação, mostrem a utilidade das DPSC na regeneração óssea *in vivo*, a sua utilização na TERM e consequente passagem para a prática clínica, depende de mais estudos bem como da acessibilidade financeira da tecnologia praticada.

#### IV Referências Bibliográficas

- Aghaloo TL, Moy PK. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007; 22: 49-70.
- Ahlmann, E., Patzakis, M., Roidis, N., Shepherd, L., and Holtom, P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Joint Surg Am* 84-A, 716, 2002.
- Aquino, R., Rosa, A. De, Lanza, V., Tirino, V., Laino, L., & Graziano, A. (2009). HUMAN MANDIBLE BONE DEFECT REPAIR BY THE GRAFTING OF DENTAL PULP STEM / PROGENITOR CELLS AND COLLAGEN SPONGE BIOCOMPLEXES, *18*, 75–83.
- Atari, M., Barajas, M., Gil, C., Fabregat, M., Padró, E. F., Giner, L., & Casals, N. (2011). Isolation of pluripotent stem cells from human third molar dental pulp, 1057–1070.
- Atari, M., Caballé-Serrano, J., Gil-Recio, C., Giner-Delgado, C., Martínez-Sarrà, E., García-Fernández, D. a, ... Giner-Tarrida, L. (2012). The enhancement of osteogenesis through the use of dental pulp pluripotent stem cells in 3D. *Bone*, 50(4), 930–41. doi:10.1016/j.bone.2012.01.005
- Atari, M., Gil-Recio, C., Fabregat, M., García-Fernández, D., Barajas, M., Carrasco, M. a, ... Giner, L. (2012). Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 14), 3343–56. doi:10.1242/jcs.096537
- Avasthi, S., Ms, R. N. S., & Ms, A. S. (2008). Stem Cell : Past , Present and Future- A Review Article, 3(1), 22–30.
- Carreira, a C., Lojudice, F. H., Halcsik, E., Navarro, R. D., Sogayar, M. C., & Granjeiro, J. M. (2014). Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *Journal of Dental Research*, 93(4), 335–45. doi:10.1177/0022034513518561

- d'Aquino, R., Graziano, a, Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, a, & Papaccio, G. (2007). Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death and Differentiation*, 14(6), 1162–71.  
doi:10.1038/sj.cdd.4402121
- Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol 2000* 2000; 24: 253–269. Bianco, P., & Robey, P. G. (2001). Stem cells in tissue engineering. *Nature*, 414, 118–121.
- Bianco, P., Kuznetsov, S. A., Riminucci, M., Fisher, L. W., Spiegel, A. M., & Robey, P. G. (1998). Reproduction of human fibrous dysplasia of bone in immunocompromised mice by transplanted mosaics of normal and Gsa-mutated skeletal progenitor cells. *Journal of Clinical Investigation*, 101, 1737–1744.
- Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., & Giannoudis, P. V. (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*, 9, 66.  
doi:10.1186/1741-7015-9-66
- Garant, Philias R. (2003). Bone, In *Oral Cells and Tissues* (pp. 200-218) New York: Quintessence, Publisinhg Co, Inc.
- Graziano, a, d'Aquino, R., Laino, G., Proto, a, Giuliano, M. T., Pirozzi, G., ... Papaccio, G. (2008). Human CD34+ stem cells produce bone nodules in vivo. *Cell Proliferation*, 41(1), 1–11. doi:10.1111/j.1365-2184.2007.00497.x
- Graziano, A., d'Aquino, R., Cusella-De Angelis, M. G., et al. (2008). Scaffold's surface geometry significantly affects human stem cell bone tissue engineering. *Journal of Cellular Physiology*, 214, 166–172.
- Graziano, A., d'Aquino, R., Cusella-De Angelis, M. G., et al. (2007). Concave pit containing scaffold surfaces improve stem cell-derived osteoblast performance and lead to significant bone tissue formation. *PLoS ONE*, 6(2), e496.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells ( DPSCs ) in vitro and in vivo, 97(25).

- Holzle, F., Kesting, M.R., Holzle, G., Watola, A., Loeffelbein, D.J., Ervens, J., and Wolff, K.D. Clinical outcome and patient satisfaction after mandibular reconstruction with free fibula flaps. *Int J Oral Maxillofac Surg* 36, 802, 2007.
- Horwitz, E. M., Prockop, D. J., Fitzpatrick, L. A., et al. (1999). Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*, 5, 309–313.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8932–8937.
- Huang, G. T.-J., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research*, 88(9), 792–806.  
doi:10.1177/0022034509340867
- Hwang, Y. C., Hwang, I. N., Oh, W. M., Park, J. C., Lee, D. S., & Son, H. H. (2007). Influence of TGF-beta1 on the expression of BSP, DSP, TGF-beta1 receptor I and Smad proteins during reparative dentinogenesis. *Journal of Molecular Histology*, Oct 11 (in press).
- Jamal, M., Chogle, S., Goodis, H., & Karam, S. M. (2011). Dental Stem Cells and Their Potential Role in Regenerative Medicine, 4, 53–61.
- Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, Pirozzi G, Papaccio G (2005) A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res* 20: 1394-1402.
- Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 2004; 428: 487–492.
- Leeb, C., Jurga, M., McGuckin, C., Moriggl, R., & Kenner, L. (2010). Promising new sources for pluripotent stem cells. *Stem Cell Reviews*, 6(1), 15–26.  
doi:10.1007/s12015-009-9102-0
- Liu, J., Jin, T., Chang, S., Ritchie, H. H., Smith, A. J., & Clarkson, B. H. (2007). Matrix

and TGF- $\beta$ -related gene expression during human dental pulp stem cell (DPSC) mineralization. *In Vitro Cellular and Developmental Biology. Animal*, 43, 120–128.

LI Jing-hui, LIU Da-yong, ZHANG Fang-ming, WANG Fan, ZHANG Wen-kui and ZHANG Zhen-ting (2011) Human dental pulp stem cell is a promising autologous seed cell for bone tissue engineering. *Chin Med J* 2011;124(23):4022-4028 DOI: 10.3760/

Liu, H.-C., E, L.-L., Wang, D.-S., Su, F., Wu, X., Shi, Z.-P., ... Wang, J.-Z. (2011). Reconstruction of alveolar bone defects using bone morphogenetic protein 2 mediated rabbit dental pulp stem cells seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide). *Tissue Engineering. Part A*, 17(19-20), 2417–33. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0620

M. Saito and K. Marumo, “Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus,” *Osteoporosis International*, vol. 21, no. 2, pp. 195–214, 2010.

Matsuura, T., Tokutomi, K., Sasaki, M., Katafuchi, M., Mizumachi, E., & Sato, H. (2014). Distinct characteristics of mandibular bone collagen relative to long bone collagen: relevance to clinical dentistry. *BioMed Research International*, 2014, 769414. doi:10.1155/2014/769414

Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5807–12. doi:10.1073/pnas.0937635100

Moraleda, J. M., Blanquer, M., Bleda, P., Iniesta, P., Ruiz, F., Bonilla, S., ... Martinez, S. (2006). Adult stem cell therapy: dream or reality? *Transplant Immunology*, 17(1), 74–7. doi:10.1016/j.trim.2006.09.030

Morscheck, C., Götz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kühn, U., Möhl, C., ... Hoffmann, K. H. (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental



- follicle of wisdom teeth. *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology*, 24(2), 155–65. doi:10.1016/j.matbio.2004.12.004
- Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 1025–1032.
- Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., & Maffulli, N. (2014). Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 9(1), 18. doi:10.1186/1749-799X-9-18
- Petite H, Viateau V, Bensaid W, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000;18:959–63.
- Pierdomenico, L., Bonsi, L., Calvitti, M., et al. (2005). Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*, 80, 836– 842
- S. S. Huja, S. A. Fernandez, K. J. Hill, and Y. Li, “Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs,” *Anatomical Record A*, vol. 288, no. 12, pp. 1243–1249, 2006.
- Salvado, F.J. (2007) “Regeneração Óssea: A Relevância dos Novos Biomateriais nas Especialidades de Estomatologia e Cirurgia Maxilo Facial”, Dissertação de Doutoramento em Medicina – Especialidade de Cirurgia Maxilo Facial, Universidade de Lisboa – Faculdade de Medicina de Lisboa, Portugal.
- Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., ... Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429), 149–55. doi:10.1016/S0140-6736(04)16627-0
- Slavkin HC, Bartold PM. Challenges and potential in tissue engineering. *Periodontol* 2000 2006; 41: 9–15.
- Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R.S., Wang, S., Shi, S., Huang, G.T. (2008) “Characterization of the Apical Papilla and its Residing Stem Cells From Human Immature Permanent Teeth – A Pilot Study”, *Journal of Endodontics*, **34**(2), pp. 166-171.

- Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B.-M., Zhang, C., ... Shi, S. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS One*, 1(1), e79. doi:10.1371/journal.pone.0000079
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- T.Matsubara, K. Suardita, M. Ishii et al., “Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells,” *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 20, no. 3, pp. 399–409, 2005.
- T. L. Aghaloo, T. Chaichanasakul, O. Bezouglaia et al., “Osteogenic potential of mandibular vs. Long-bone marrow stromal cells,” *Journal of Dental Research*, vol. 89, no. 11, pp. 1293–1298, 2010.
- Wiley, J. (2009). Stem cells and future periodontal regeneration, 51, 239–251.
- Y. Chai and R. E. Maxson Jr., “Recent advances in craniofacial morphogenesis,” *Developmental Dynamics*, vol. 235, no. 9, pp. 2353–2375, 2006.
- Velchuru, V.R., Satish, S.G., Petri, G.J., and Sturzaker, H.G. Hernia through an iliac crest bone graft site: report of a case and review of the literature. *Bull Hosp Jt Dis* 63, 166, 2006.
- Yamada, Y., Ito, K., Nakamura, S., Ueda, M., & Nagasaka, T. (2011). Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow. *Cell Transplantation*, 20(7), 1003–13. doi:10.3727/096368910X539128
- Zhang, W., Walboomers, X. F., van Kuppevelt, T. H., Daamen, W. F., Bian, Z., & Jansen, J. a. (2006). The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials*, 27(33), 5658–68. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.07.013

Zheng, Y., Liu, Y., Zhang, C. M., Zhang, H. Y., Li, W. H., Shi, S., ... Wang, S. L.  
(2009). Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. *Journal of Dental Research*, 88(3), 249–54. doi:10.1177/0022034509333804

Zijderveld, S.A., ten Bruggenkate, C.M., van, Den, Bergh, J.P., and Schulten, E.A.  
Fractures of the iliac crest after splitthickness bone grafting for preprosthetic surgery: report of 3 cases and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 62, 781, 2004.